

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 3 月 29 日 (29.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
**WO 01/21187 A1**

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 38/00, 9/14 [JP/JP]; 〒662-0052 兵庫県西宮市霞町3番20-504号 Hyogo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06303
- (22) 国際出願日: 2000 年 9 月 14 日 (14.09.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願平11/263048 1999 年 9 月 17 日 (17.09.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (73) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山縣 豊 (YAMAGATA, Yutaka) [JP/JP]; 〒654-0122 兵庫県神戸市須磨区道正台1丁目1番8-207号 Hyogo (JP). 道園隆行 (DOEN, Takayuki) [JP/JP]; 〒565-0841 大阪府吹田市上山手町66番12-311号 Osaka (JP). 浅川直樹 (ASAKAWA, Naoki) [JP/JP]; 〒569-1146 大阪府高槻市赤大路町44番2-202 Osaka (JP). 高田重行 (TAKADA, Shigeyuki)
- (74) 代理人: 弁理士 高橋秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING PROTEIN POWDER

(54) 発明の名称: タンパク質粉体の製造法

(57) Abstract: A process for conveniently producing a stable protein powder sustaining the higher-order structure at a high level which comprises freezing a protein-containing solution at a cooling speed of about -300 to -10°C/min and then drying.

(57) 要約:

タンパク質含有溶液を約-300~-10℃/分の冷却速度で凍結後、乾燥することにより、高次構造を高く保持した安定なタンパク質粉体の簡便な製造法を提供する。

WO 01/21187 A1



## 明細書

## タンパク質粉体の製造法

## 5 技術分野

本発明は、タンパク質粉体の製造法および、該タンパク質粉体を用いることを特徴とする徐放性製剤、さらには特定の基剤を用いることを特徴とする徐放性製剤等に関する。

## 10 背景技術

近年、遺伝子工学および細胞工学の手法の発達により、大腸菌、酵母、動物細胞あるいはヤギ、ハムスター等の生体を用いてタンパク質医薬品が大量に生産され、臨床への応用が図られている。しかしながら、これらのタンパク質は酸性条件および酵素消化に対し極めて反応性が高いため経口吸収されない。そこで一般に皮下あるいは筋肉内投与されるが、生体内での半減期が短いため、頻回投与が必要であり、注射に伴う患者の肉体的負担は無視できないものがある。

例えば、成長ホルモン（以下、GHと略記することがある）は、元来下垂体前葉で生産・分泌される代表的なホルモんで、身体の成長促進に働くほか、糖・脂質代謝、タンパク同化、細胞増殖や分化に関与する等、幅広く多彩な生理作用を有するタンパク質であり、現在では遺伝子組換え技術を用いて大腸菌により大量生産され、医薬品として全世界で広く臨床応用されている。しかし、GHは生体内半減期が短く、有効血中濃度を維持するためには頻回投与が必要である。とりわけ、下垂体性小人症の場合には、乳幼児あるいは若年患者に対して、数ヶ月から10年以上の長期にわたる連日皮下投与がなされているのが実状である。

この様なタンパク質医薬品固有の問題に対処するため、薬物送達システムに関する種々の研究が行われてきた。例えば、タンパク質を長期間にわたって持続放出する徐放剤である。特開平8-217691号公報（WO 96/07399号公報）には、水溶性ペプチド性生理活性物質を塩化亜鉛水溶液等により水不溶性ないし水難溶性多価金属塩とし、これと生体内分解性ポリマーとを含有してなる

徐放性製剤の製造法が開示されている。また、特表平8-503950号公報(WO 94/12158号公報)には、ヒトGH(以下、hGHと略記することがある)と生分解性ポリマーとの徐放性製剤の製法として、hGHとポリマーとを含有する有機溶媒溶液を液体窒素中に噴霧し多孔性粒子として生物活性を保持した形で徐放性マイクロカプセルを調整する方法が開示されている。更に、特表平10-504017号公報(WO 95/29664号公報)には、炭酸亜鉛等を固体状でポリマー溶液に分散させた後、生理活性物質(ホルモン等)を添加し、生理活性物質と金属カチオンとを別々に生体分解性ポリマーに分散させてなる徐放性マイクロカプセルの製造法が開示されている。特開平10-231252号公報(WO 98/27980号公報)および特開平10-7538号公報(WO 97/01331号公報)に生理活性ポリペプチド含有徐放性製剤の製造方法が開示されているが、該生理活性ポリペプチドの凍結乾燥条件については記載されていない。

このようにタンパク質の生理活性を保持しながら薬物送達システムを構築する試みは種々なされているものの、高次構造を持つタンパク質固有の問題として、製剤工程中での変性、製剤中での経時的変化による変性、および/または投与後の生体内での変性等に由来するタンパク質の安定性に関する問題が見られる可能性がある。具体的には、徐放性製剤における、製剤内へのタンパク質取り込み効率の低さ、投与初期の過大な薬物放出、長期間にわたる薬物放出制御の困難さ、製剤投与後の低い血中濃度等の問題が解決されないで残る可能性がある。

しかしながら、タンパク質を微細な粉体として調製できれば、分子運動性の低下により、さらなる安定性の向上が見込まれる。

タンパク質微細粉体の製造法として、特表平4-500527号公報(WO 90/13285号公報)にはタンパク質水溶液を液化ガス中に噴霧し凍結後、乾燥する方法が開示されている。

この他にも、タンパク質微細粉体の製造法として、ジャーナル オブ ファーマシューティカルサイエンス(Journal of Pharmaceutical Sciences)第87巻、152頁(1998)にスプレードライ法が報告されているが、噴霧して得られたタンパク質水溶液粒子径に逆相関してタンパク質の変性度が上昇すること、それを抑制

するためには界面活性剤を多量に添加しなければならないことが記載されている。

さらに、本願優先日より後に公開されたWO 99/48519号公報には生理活性ポリペプチド水溶液に、水混和性の有機溶媒及び／又は揮発性の塩類を添加後、凍結乾燥して得られる生理活性ポリペプチド粉体の製造法が記載されている。

- 5      また、特開平9-248177号公報には凍結温度以下に冷却した金属板上に微生物菌体培養物の小滴を滴下して急速凍結させる乾燥微生物菌体の製造法が記載されている。

- 凍結乾燥時の冷却速度は、一般に $-10^{\circ}\text{C}/\text{分}$ より遅い。例えば、医薬品の凍結乾燥IV、(大橋洋次著、製剤と機械、第8頁、昭和63年1月15日、クレスト社発行)には、  
10      「通常のバイアルでの凍結乾燥は、特別な装置でない限り急速凍結することやガラス状態を生ずるような糖類の高濃度溶液を使用することは余りない。すなわち、冷却速度は $0.3 \sim 5.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ であり、」と記載されている。一方、液体窒素等の液化ガスに水溶液を噴霧する場合の冷却速度は極めて速く、例えば液体窒素の場合 $-300^{\circ}\text{C}/\text{分}$ より速い。

- 15      なお、本明細書においては冷却速度にマイナスをつけて表現しているが、これは単に冷却することを意図してマイナスをつけている。従って、例えば冷却速度 $-300^{\circ}\text{C}/\text{分}$ とは、測定対象物が1分間当たり $300^{\circ}\text{C}$ 冷却されることを示しており、測定対象物が30秒間で $150^{\circ}\text{C}$ 冷却される場合、その冷却速度は $-300^{\circ}\text{C}/\text{分}$ として示される。具体的には、測定対象物が、30秒間で $20^{\circ}\text{C}$ から $-130^{\circ}\text{C}$ まで冷却された場  
20      合、その冷却速度は $-300^{\circ}\text{C}/\text{分}$ として示される。

液化ガス中に噴霧し凍結後、乾燥するタンパク質粉体の製造法では、スプレードライ法と同様にタンパク質の変性が生じる可能性が高く、さらに液体冷媒として液化ガスを用いるため、断熱や温度差による機器材質の膨張収縮への対応、無菌保持、および液化ガスの排気等に大がかりで高価な設備が必要になる。

- 25      また、多量の界面活性剤を用いることにより、平均粒子径が数ミクロンのタンパク質微細粉体を得られるものの、多量の界面活性剤を含有するため、その用途は限定される。

そこで、高次構造を高く保持した安定なタンパク質粉体を、液化ガスに接触させることなく、簡便に提供することが求められている。

## 発明の開示

本発明者らは前記の問題を解決するため鋭意研究を進め、タンパク質粉体を製造する際、タンパク質含有溶液を凍結させるための冷却速度を調整することにより、高次構造を高く保持したタンパク質粉体が見いだした。さらに得られたタンパク質粉体を微粒化処理することにより微細粉体とすることができることを見出した。加えて、本発明者らは、こうして得られたタンパク質微細粉体を徐放性製剤に用いることにより、該製剤におけるタンパク質の封入率、投与初期の過大な薬物放出および徐放性が改善されることを見いだした。

- 10 また、凍結の際にタンパク質含有溶液を塗布または滴下することにより、冷却速度の調整を行うと共に、高次構造を高く保持したタンパク質粉体が見いだした。

さらに、前記凍結を医薬品の凍結乾燥に通常用いられる凍結乾燥機の棚を用いることにより、より安価に、さらに簡便に製造することができることを見出した。

- 15 これらの知見に基づき、本発明者らは発明を完成させた。

すなわち、本発明は、

(1) タンパク質含有溶液を冷媒に充填して約 $-300^{\circ}\text{C}$ ～ $-10^{\circ}\text{C}$ /分の冷却速度で凍結後、乾燥することを特徴とするタンパク質粉体の製造法、

(2) タンパク質含有溶液を冷媒に塗布または滴下することを特徴とする上記

- 20 (1) 記載の製造法、

(3) 塗布または滴下する際、滴下流体の直径が約0.1ないし40mmである上記(2)記載の製造法、

(4) タンパク質含有溶液を液体冷媒に直接接触させないで凍結することを特徴とする上記(1)記載の製造法、

- 25 (5) タンパク質含有溶液に、揮発性の塩類あるいは水混和性の有機溶媒を添加することを特徴とする上記(1)記載の製造法、

(6) 揮発性の塩類が酢酸アンモニウムである上記(5)記載の製造法、

(7) 上記(1)記載の製造法で得られるタンパク質粉体、

(8) タンパク質が、分子量 約5,000ないし1,000,000ダルトンである上記(7)

記載のタンパク質粉体、

(9) タンパク質が、ホルモン、サイトカイン、造血因子、増殖因子または酵素である上記(7) 記載のタンパク質粉体、

5 (10) タンパク質が成長ホルモンまたはインスリンである上記(7) 記載のタンパク質粉体、

(11) タンパク質が、タンパク質含有溶液中の $\alpha$ -ヘリックス含量に対して約45%以上の $\alpha$ -ヘリックスを保持していることを特徴とする上記(7) 記載のタンパク質粉体、

10 (12) 請求項7に記載のタンパク質粉体を微粒化処理することを特徴とするタンパク質微細粉体の製造法、

(13) タンパク質微細粉体の平均粒子径が約0.5ないし20 $\mu\text{m}$ となるように微粒化処理することを特徴とする上記(12) 記載の製造法、

(14) 上記(12) 記載の製造法で得られたタンパク質微細粉体を含有する徐放性製剤、

15 (15) 徐放性製剤の基剤が生体由来物質または合成ポリマーである上記(14) 記載の徐放性製剤、

(16) 生体由来物質または合成ポリマーが、生体内分解性ポリマーである上記(15) 記載の徐放性製剤、

20 (17) 乳酸とグリコール酸のモル比が約60:40~70:30の乳酸-グリコール酸共重合体および成長ホルモンを含有する徐放性製剤、

(18) 上記(12) 記載の製造法で得られたタンパク質微細粉体を用いることを特徴とする徐放性製剤の製造法、

(19) タンパク質含有徐放性製剤を製造するための上記(7) 記載のタンパク質粉体の使用、

25 (20) タンパク質含有溶液を、噴霧して凍結しないことを特徴とする上記(1) 記載の製造法、

(21) 塗布または滴下前に約-25℃以下に冷却した冷媒1300cm<sup>2</sup>当たり、約10~250mL/5分速度で、タンパク質含有溶液を塗布または滴下することを特徴とする上記(1) 記載の製造法、

- (22) 減圧下乾燥することを特徴とする上記(1)記載の製造法、および、  
(23) 凍結乾燥機の棚を用いて凍結する上記(1)記載の製造法に関する。

#### 図面の簡単な説明

- 5 図1は、免疫抑制SDラットにおける、それぞれ、塗布〔塗布量：10mL／5分（－▲－），60mL／5分（－●－）〕および噴霧〔噴霧量：50mL／5分（－△－），80mL／5分（－○－）〕により凍結させて得られたhGH粉体を用いて作成したマイクロカプセル投与後の血清中hGH濃度推移を示すグラフである。

#### 10 発明を実施するための最良の形態

本発明におけるタンパク質は、天然物、合成物、半合成物、あるいは遺伝子組換え法により作製されたもの等のいずれでもよく、更にそれらの誘導体、類縁体ないしムテインでもよい。一般に、高純度のタンパク質を大量に得るためには、遺伝子組換え法が用いられることが多い。

- 15 本発明におけるタンパク質としては、好ましくは分子量約5,000ないし約1,000,000ダルトン、さらに好ましくは分子量約6,000ないし約200,000ダルトンのタンパク質が挙げられる。

本発明におけるタンパク質としては、具体的には、ホルモン、サイトカイン、造血因子、増殖因子、酵素等が挙げられる。

- 20 前記ホルモンとしては、作動性あるいは拮抗性のいずれの作用機作を有するものでもよい。ホルモンとしては、具体的には、インスリン、成長ホルモン（GH）、プロラクチン、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、黄体形成ホルモン（LH）、卵胞刺激ホルモン（FSH）、ヒト絨毛ゴナドトロピン（HCG）、サイモシン（チモシン）、副甲状腺ホルモン（PTH）等、好ましくはインスリンおよび成長ホルモン、より好ましくは成長ホルモンが挙げられる。

該成長ホルモンとしては、いずれの種由来のものでも良いが、好ましくはヒト成長ホルモンが挙げられる。また、脳下垂体等から抽出される天然由来のものも本発明に用いられるが、好ましくは遺伝子組換え型GH（特公平6-12996号公報、特公平6-48987号公報参照）であり、更に好ましくはN末端にメ



チオニンを有さない天然型と同じ構造を有する組換え型 hGH である。このような、N 末端にメチオニンを有さない天然型と同じ構造を有する組換え型 hGH は、特開平 10-72489 号公報 (EP-A-812856 号公報) または WO 00/20439 号公報に記載された方法によって得ることができる。該 GH としては金属塩 (金属複合体も含む。例えば、金属としては亜鉛等が挙げられる。) であってもよいが、実質的に金属を含有しない GH も用いられる。hGH として、分子量約 22 Kダルトンのみならず、分子量約 20 Kダルトンのもの (特開平 7-101877 号公報、特開平 10-265404 号公報参照) を用いてもよい。また、hGH として、hGH の誘導体あるいはその関連タンパク質 (WO 99/03887 号公報参照) を用いてもよい。

前記サイトカインとしては、例えばリンホカイン、モノカイン等が用いられる。リンホカインとしては、例えばインターフェロン類 (アルファ型、ベータ型、ガンマ型等)、インターロイキン類 (例えば、IL-2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 等) 等が用いられる。該モノカインとしては、例えばインターロイキン-1 (IL-1)、腫瘍壊死因子 (TNF) 等が用いられる。サイトカインとしては、好ましくはリンホカイン等、更に好ましくはインターフェロン等、特に好ましくはインターフェロンアルファ等である。

前記造血因子としては、例えばエリスロポエチン (EPO)、コロニー刺激因子 (G-CSF, GM-CSF, M-CSF 等)、トロンボポエチン (TPO)、血小板増殖刺激因子、メガカリオサイトポテンシエーター等が用いられる。

前記増殖因子としては、例えば、塩基性あるいは酸性の繊維芽細胞増殖因子 (FGF) あるいはこれらのファミリー (例えば、EGF、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、PDGF、酸性 FGF、塩基性 FGF、FGF-9 等)、肝細胞増殖因子 (HGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、神経細胞増殖因子 (NGF) あるいはこれらのファミリー (例えば、BDNF、NT-3、NT-4、CNTF、GDNF 等)、インスリン様成長因子 (例えば、IGF-1、IGF-2 等)、骨増殖に関与する因子 (BMP) あるいはこれらのファミリー等が用いられる。

前記酵素としては、例えばスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、ウロキナーゼ、ティシュープラスミノゲンアクティベーター (TPA)、アスパ

ラギナーゼ、カリクレイン等が用いられる。

この他にも本発明におけるタンパク質として、サイモポエチン、血中胸腺因子 (F T S) 及びその誘導体 (米国特許第 4, 2 2 9, 4 3 8 号参照)、及びその他の胸腺因子 [医学のあゆみ、第 1 2 5 巻、第 1 0 号、8 3 5 - 8 4 3 頁 (1 9 8 3 年)] 等を用いることができる。

本発明におけるタンパク質としては、好ましくはホルモン、より好ましくは成長ホルモンまたはインスリン、さらに好ましくはヒト成長ホルモンが用いられる。

本発明におけるタンパク質は、金属を含有するタンパク質であってもよい。金属を含有するタンパク質の金属含有量は、好ましくは約 0. 1 % (w/w) 以下、さらに好ましくは約 0. 0 1 % (w/w) 以下、より好ましくは 0. 0 0 1 % (w/w) 以下、とりわけ実質的に金属を含まないタンパク質が最適である。金属を含有するタンパク質として、例えば、結晶性インスリンが挙げられる。結晶性インスリンは、通常、亜鉛、ニッケル、コバルト、カドミウム等の少量の重金属を含んでいる。亜鉛を 0. 4 % (w/w) を含んでいるインスリンは 6 量体で存在し、それ自身で安定に存在し、生体内分解性高分子重合物の金属塩との相互作用が弱められると考えられている。

本発明におけるタンパク質は、前もって金属を除去したタンパク質であってもよい。タンパク質の金属を除去する方法としては公知の方法が用いられる。例えば、インスリンにおいては、インスリンの塩酸酸性水溶液を水あるいは酢酸アンモニウム塩溶液に対して透析した後、凍結乾燥することにより、金属含量が極めて低いアモルファス状態のインスリンを得ることができる。

また、タンパク質を得る際に、所望のタンパク質を含有する組織・体液、化学合成粗調製物、あるいは組換え細胞・菌体から、それぞれ当該タンパク質を純化・精製する必要がある時には、一般的なタンパク質の分離精製法が使用できる (「タンパク質」、佐竹一夫著、朝倉書店; 「生理活性ペプチド」、ファルマシアレビュー、No. 3、日本薬学会)。それらの分離精製法の中でもとりわけ、幾つかの液体クロマトグラフィーを組み合わせることにより (「タンパク質・ペプチドの高速液体クロマトグラフィー」、宇井信生ら共編、化学同人)、高純度のタンパク質をその生理活性を損なうことなく収率よく得ることができる。その際、分離精

製法の最終工程において、脱塩操作に供されることが好ましい。

本発明のタンパク質含有溶液の溶媒は、タンパク質を溶解するものであれば特  
に限定されない。該溶媒としては、好ましくは凝固点が約 $-130^{\circ}\text{C}$ 以上の溶媒  
が挙げられる。該溶媒の具体例としては、水、アルコール類（例、メタノール、  
5 エタノール、イソプロパノール等）、アセトン、前記アルコール類と水との混合  
溶媒、またはアセトン等の有機溶媒と水との混合溶媒等が挙げられ、好ましくは  
水が用いられる。アルコール類、アセトン等の有機溶媒は、後述する「水混和性  
の有機溶媒」として用いることもできる。

前記溶媒を用いたタンパク質含有溶液は、揮発性の塩類あるいは水混和性の有  
10 機溶媒が添加されていることが好ましい。このような揮発性の塩類あるいは水混  
和性の有機溶媒の添加により得られるタンパク質水溶液を、更に凍結乾燥するこ  
とにより、取り扱いが容易で（操作性のよい）、かつ微細な（粒子径の小さな）  
タンパク質粉体を製造することができる。

該タンパク質含有溶液に添加される揮発性の塩類としては、例えばアンモニウ  
15 ム塩（例えば酢酸アンモニウム、重炭酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化  
アンモニウム等、好ましくは酢酸アンモニウム等）が挙げられる。これらは適宜  
の割合で混合して用いてもよい。揮発性の塩類のタンパク質含有溶液への添加量  
は、モル比において、例えば約1倍ないし約80倍モル（具体的には、約10倍  
ないし約80倍モル）であり、好ましくは約10倍ないし約70倍モルであり、  
20 さらに好ましくは約15倍ないし約70倍モルであり、より好ましくは約15倍  
ないし約50倍モルであり、最も好ましくは約15倍ないし約40倍モルである。

該タンパク質含有溶液に添加される水混和性の有機溶媒としては、例えば上記  
したアルコール類、アセトン等が用いられるが、これらは適宜の割合で混合して  
用いてもよいが、好ましくはアルコール類、特にエタノールを単独で用いること  
25 が望ましい。また、タンパク質含有溶液への添加量（濃度）は、体積比において  
約0.03ないし0.5%（V/V）であり、好ましくは約0.06ないし0.25%  
（V/V）、更に好ましくは約0.1ないし0.15%（V/V）である。

該タンパク質含有溶液に添加される水混和性の揮発性の塩類及び／又は有機溶  
媒は、単独で用いてもよいし、適宜組み合わせ用いてもよい。水混和性の有機

溶媒及び揮発性の塩類を組合せて用いる時は、上記のそれぞれの添加量に従って、タンパク質含有溶液に添加することができる。

タンパク質含有溶液には、揮発性の塩類が添加されていることが好ましく、アンモニウム塩が添加されていることがより好ましく、酢酸アンモニウムが添加されていることがさらに好ましい。

凍結操作に供するタンパク質含有溶液の濃度は、特に限定されないが、例えば 0.01% (W/V) ないし 30% (W/V)、好ましくは 0.03% (W/V) ないし 10% (W/V)、特に好ましくは 0.05% (W/V) ないし 3% (W/V) 等である。例えば、タンパク質が hGH である場合のタンパク質含有溶液の濃度は、好ましくは約 0.01 ないし約 5% (W/V)、さらに好ましくは、約 0.05 ないし約 2% (W/V)、より好ましくは約 0.05 ないし約 0.5% (W/V) である。

凍結操作に供するタンパク質含有溶液中のタンパク質は、単一のタンパク質であることが好ましい。

本発明におけるタンパク質含有溶液の凍結および乾燥のための方法は、特に限定されないが、減圧下乾燥（例、真空乾燥）することが好ましい。例えば、凍結乾燥機で連続した工程で行っても、凍結乾燥機とは別のところで凍結させたタンパク質含有溶液を凍結乾燥機で乾燥させてもよい。

前記凍結のための装置は特に限定されないが、タンパク質粉体を、安価に、そして簡便に製造する観点から、通常医薬品注射剤を凍結乾燥するときに使用される凍結乾燥装機の棚（凍結乾燥棚）で行うことが好ましい。該凍結乾燥機に関しては、小林正和著「医薬品製造と凍結乾燥技術」（製剤と機械、No. 17～23、25～35、38～46）に詳しい。それによると、通常のブラインを用いる冷却では凍結乾燥棚を-70℃まで温度を下げるのが可能である。これらの凍結乾燥機としては、例えば、共和真空技術株式会社製（例、RL シリーズ、RLC シリーズ、RLE シリーズ、R2L シリーズ、R2LW シリーズ、または Triomaster シリーズ）、日本真空技術株式会社製（例、DF シリーズ、DFM シリーズ）等が挙げられる。また、これらの凍結乾燥機の予備凍結庫は本来医薬品注射剤製造用に無菌無塵に対応できるように設計されていることから、タンパク質粉体の製造に適している。凍結乾燥機

の一次媒体として液化ガスを用いて、二次媒体を介して導入することにより、凍結乾燥棚の温度を通常のラインで達成されるより更に低下させることも可能である。例えば、一次媒体として液体窒素を用い、二次媒体としてハイドロフルオロエーテル（HFE：スリーエム（3M）社製）を介して冷却すれば、HFE-7100（スリーエム（3M）社製）で-135℃、HFE-72100（スリーエム（3M）社製）で-117℃まで、  
5 それぞれ冷却することが可能になる。この様な方法を用いることで、タンパク質含有溶液を直接液化ガスに接触させることが回避され、液化ガスの無菌無塵処理という困難な問題に直面する必要がなくなる。好ましい棚の温度は約-130～-20℃、さらに好ましくは約-100～-30℃、より好ましくは約-80～-40℃である。この様に凍結乾燥機棚を用いてタンパク質含有溶液を凍結することにより、その後、速やかに真空乾燥工程に移行することが可能になる。

凍結は凍結乾燥機の棚の上に置かれた冷媒上で行うことが好ましい。該冷媒は、特に限定されないが、好ましくはタンパク質含有溶液を塗布または滴下可能な冷媒、例えば板、トレイ等、好ましくはトレイ等が挙げられる。前記板およびトレイ等は平面には限定されず凹凸を有していても、弯曲していてもよい。前記板およびトレイ等の材質は本発明の冷却速度に耐えられるものであればいかなる材質でもよいが、好ましくは金属（例えば、ステンレス等）製が用いられる。塗布または滴下開始時の冷媒（例えば、トレイ）の温度は、好ましくは約-25℃以下（例えば、-25℃～-100℃；具体的には-25℃～-50℃）であることが好ましい。なお、凍結させたタンパク質含有溶液上に、さらに塗布または滴下を行ってもよい。塗布または滴下開始時の凍結させたタンパク質含有溶液の表面温度は、好ましくは約-25℃以下（例えば、-25℃～-100℃；具体的には-25℃～-50℃）であることが好ましい。冷媒および凍結させたタンパク質含有溶液の表面温度は、例えば温度センサー〔例えば、熱電対（TYPE T：  
20 岡崎製作所製）〕を用いて測定することができる。

また、凍結乾燥機とは別のところで凍結させたタンパク質含有溶液を凍結乾燥機で乾燥させる場合は、例えば、タンパク質含有溶液を凍結した後、その状態を保持したまま、凍結乾燥機の棚に移送して乾燥する方法が挙げられる。

本発明におけるタンパク質含有溶液の冷却速度は、目的とするタンパク質微細

粉体の平均粒子径、タンパク質含有溶液の種類、タンパク質濃度、添加物濃度等により、適宜制御される。本発明におけるタンパク質含有溶液の冷却速度は、通常、約-300~-10℃/分、好ましくは約-250~-20℃/分、より好ましくは約-210℃/分~-30℃/分、さらに好ましくは-210~-40℃/分、とりわけ好ましくは-210~-70℃/分である。本発明における冷却速度は、塗布または滴下前のタンパク質含有溶液の温度、滴下または塗布後のタンパク質含有溶液の凍結時の温度および凍結までの時間を基に算出される。なお、滴下または塗布後のタンパク質含有溶液の凍結時の温度は、例えば前記と同様の温度センサーを用いて測定することができる。

- 10 前記冷却速度を得る方法として、例えば、塗布または滴下前に約-25℃以下（好ましくは約-100~-25℃、より好ましくは約-100~-30℃、さらに好ましくは約-80~-40℃）に冷却した冷媒1300cm<sup>2</sup>当たり、約10~250mL/5分、好ましくは約15~200mL/5分で、より好ましくは約20~175mL/5分の速度で、タンパク質含有溶液を塗布または滴下する方法が挙げられる。タンパク質含有溶液を充填（塗布または
- 15 滴下）する速度は、上記冷却速度を得ることができる範囲から適宜選択することができる。また、充填途中で、タンパク質含有溶液の塗布または滴下の速度を適宜変更してもよい。なお、塗布または滴下中の冷媒の温度は約-2℃程度になってもよい。

- 本発明における塗布とは、開口部（例えば、タンパク質含有溶液の充填ノズル）より、タンパク質含有溶液を液滴となることなく連続的な流体として充填することを示す。
- 20

本発明における滴下とは、開口部（例えば、タンパク質含有溶液の充填ノズル）より、タンパク質含有溶液の液滴を形成させて、非連続的な流体として充填することを示す。

- 25 塗布又は滴下の際、凍結させようとするタンパク質含有溶液の全量を一気に塗布又は滴下することもできるが、何回かに分けて間欠的に塗布又は滴下することが既凍結部の温度を低下させるために好ましい。これによって所望の冷却速度を維持することができる。間欠的に塗布又は滴下する場合、冷媒または既凍結部の表面温度が-25℃以下になるまで、塗布と塗布あるいは滴下と滴下との間に時間的

間隔をおくことが好ましい。

本発明において、滴下流体とは、前記塗布時の液滴となることなく充填される連続的な流体および滴下時の非連続的な流体の両者を示す。タンパク質含有溶液を塗布または滴下する際の、タンパク質含有溶液の滴下流体の直径（水平断面の最大長さ）は、例えば約0.1～40mm、好ましくは約0.2～40mm、より好ましくは約0.3～20mm、さらに好ましくは約0.3～10mmである。タンパク質含有溶液を塗布する際の滴下流体の形状は、円柱状が好ましいが、例えば多角柱（例えば、三角柱、四角柱、五角柱、六角柱等）等開口部の形状により様々な形状にすることができる。また、タンパク質含有溶液を滴下する際の液滴の直径は、好ましくは約0.1～10mm、さらに好ましくは約0.7～7mm、より好ましくは約1～5mmである。タンパク質含有溶液を滴下する際の開口部（例えば充填ノズル）の直径は、好ましくは約0.05～10mm、より好ましくは約0.1～5mmである。また、タンパク質含有溶液を滴下する際の液滴の重量は好ましくは約0.0005～500mg、より好ましくは約0.2～180mg、さらに好ましくは約0.5～65mgである。

本発明において、タンパク質含有溶液を塗布または滴下する際、冷媒上に予め、氷床（ice laying）を作成しておくことも可能である。

また、本発明において、タンパク質含有溶液を凍結させる際、タンパク質含有溶液を層状に凍結させることも可能である。その際の凍結層の厚さは、好ましくは約0.5～100mm、さらに好ましくは約1～80mm、より好ましくは約3～50mmである。

本発明の方法により得られたタンパク質粉体を、より微細な粒子にするために、さらに微粒化処理することが好ましい。微粒化処理には、医薬品製剤の調製において知られた種々の粉体粉碎処理方法を用いることができる。該粉体粉碎処理法として、例えば、乾式粉碎法としては、ジェットミル法等が挙げられる、また湿式粉碎法としては、タンパク質微細粉体をその不溶性溶媒に分散させた後、超音波処理（プローブ型およびバス型）、攪拌型粉碎器（ポリトロン（キネマチカ社製）、ミニミクサー、フィルミックス（特殊機化社製）、クレアミックス（Mテック社））等で処理後に該溶媒を除去する方法が挙げられる。また、本発明の方法により得られたタンパク質粉体は、タンパク質粉体の不溶性溶媒（例えば、ジクロロメタン等）中で、軽く攪拌あるいは軽く振盪することによっても微粒化

することができる。

得られたタンパク質粉体を徐放性製剤に適用する場合は、タンパク粉体を直接、基剤（例、生体内分解性ポリマー溶液）中に添加後、超音波もしくは攪拌型粉碎器等により微粒化処理を行うことが好ましい。

- 5      例えば、攪拌型粉碎器として回転径が約9 mmのポリトロン（キネマチカ社）を用いる際は、好ましくは約5 0 0 ～4 0 0 0 0 r p m、より好ましくは約1 0 0 0 ～3 5 0 0 0 r p m、さらに好ましくは約5 0 0 0 ～3 0 0 0 0 r p mの回転数で微粒化処理を行うことが好ましい。その際の攪拌時間は好ましくは約5 秒～3 0 分、より好ましくは約1 0 秒～2 0 分、さらに好ましくは約1 5 秒～1 0
- 10   分である。例えば、攪拌型粉碎器として回転径が約9 mmのポリトロン（キネマチカ社）を用いる際は、好ましくは約5 0 0 ～4 0 0 0 0 r p mで約5 秒～3 0 分間、より好ましくは約1 0 0 0 ～3 5 0 0 0 r p mで約1 0 秒～2 0 分間、さらに好ましくは約5 0 0 0 ～3 0 0 0 0 r p mで約1 5 秒～1 0 分間微粒化処理を行うことが好ましい。

- 15   微粒化処理後のタンパク質微細粉体の平均粒子径はそれを応用する薬物送達システムによっても異なるが、一般に、好ましくは約0.5～20  $\mu$ m、さらに好ましくは0.7～10  $\mu$ m、より好ましくは約1～5  $\mu$ mである。本発明におけるタンパク質微細粉体の平均粒子径は、レーザー回折式粒度分布測定装置（SALD 2000A：島津製作所株式会社製）により測定することができる。前記測定においてタンパク質微細
- 20   粉体は、タンパク質微細粉体の不溶性溶媒（例えば、ジクロロメタン等）に分散後、前記粒度分布測定装置の測定可能範囲まで、適宜、該溶媒にて希釈し供される。

- 本発明により製造されたタンパク質粉体およびタンパク質微細粉体は、本発明の製造法を行う前におけるタンパク質含有溶液（例、タンパク質含有水溶液）中
- 25   のタンパク質と比較しても、高次構造を高い割合で保持している。

タンパク質粉体およびタンパク質微細粉体中の二次構造は、FT-IR スペクトル解析より確認することが可能である。この解析はカーペンターらの総説（ユーロピアン ジーナル オブ ファーマシューティクス アンド バイオフーマシューティクス（European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics）45



巻 231-238頁 1998年) に詳しい。それによると、凍結乾燥して得られたタンパク質粉体およびタンパク質微細粉体中の二次構造の 1 つである  $\alpha$ -ヘリックスの含量は、水溶液中のタンパク質の含量より低下することが報告されており、変性度が高いほどその低下率が高いことが示されている。そこで、FT-IR スペクトル解析して得られる本発明の製造法を行う前におけるタンパク質含有溶液 (例、タンパク質含有水溶液) 中のタンパク質の  $\alpha$ -ヘリックス含量に対する本発明の製造法で得られたタンパク質粉体あるいはタンパク質微細粉体中の  $\alpha$ -ヘリックス含量の割合から、タンパク質の高次構造の変性度を定義できる。

前記方法により、タンパク質の変性度を定義した時、本研究により得られたタンパク質粉体およびタンパク質微細粉体は  $\alpha$ -ヘリックスを約 45% 以上保持していることが好ましく、約 50% 以上保持していることがさらに好ましい。

本発明で得られた高次構造 (具体的には二次構造、より具体的には  $\alpha$ -ヘリックス) を保持したタンパク質粉体およびタンパク質微細粉体は種々の薬物送達システムに応用される。その投与経路としては、経肺、経粘膜 (眼、口腔、鼻、子宮、膣、直腸)、経口、経皮、筋肉内、皮下、臓器等への注射剤または埋め込み剤等が挙げられる。タンパク質粉体およびタンパク質微細粉体は粉体のまま投与することもできるが、種々の剤形 (例、錠剤、顆粒剤、徐放性製剤等) に処方して用いることができ、好ましくは徐放性製剤に処方して投与される。該徐放性製剤は、タンパク質粉体あるいはタンパク質微細粉体と後述する種々の基剤とを用いることにより、打錠法、スプレーチリング法、スプレードライ法 (噴霧乾燥法)、乳化法、水中乾燥法 (S/O/W 法) または相分離法 (コアセルベーション法) 等により処方することができる。

前記徐放性製剤を処方する際に用いる基剤は、生体由来のもの、あるいは合成により得られたもの (例、合成ポリマー) のいずれでもよいが、合成ポリマーを用いることが多い。

生体由来の基剤としては、ゼラチン、コラーゲン、油脂 (脂質、トリグリセライド等)、血清由来タンパク質 (アルブミン、グロブリン等)、ケラチン、キチン、キトサン、プルラン、セルロース類 (ヒドロキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース等) が挙げられる。

合成ポリマーとしては、生体内分解性ポリマーと生体内非分解性ポリマーのいずれを用いることもできるが、生体内分解性ポリマーを用いることが好ましい。

前記徐放性製剤の基剤に用いられる生体内分解性ポリマーとしては、例えば $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸類（例えば、グリコール酸、乳酸等）、ヒドロキシジカルボン酸類（例えば、リンゴ酸等）、ヒドロキシトリカルボン酸（例えば、クエン酸等）等の1種以上から無触媒脱水重縮合で合成され、遊離のカルボキシル基を有する重合体あるいはこれらの混合物、ポリ- $\alpha$ -シアノアクリル酸エステル、ポリアミノ酸（例えば、ポリ- $\gamma$ -ベンジル-L-グルタミン酸等）、無水マレイン酸系重合体（例えば、スチレン-マレイン酸重合体等）等が挙げられる。これらはホモポリマーまたはコポリマーのいずれであってもよい。重合の形式は、ランダム、ブロック、グラフトのいずれでもよい。また、上記の $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸類、ヒドロキシジカルボン酸類、ヒドロキシトリカルボン酸類が分子内に光学活性中心を有する場合、D-、L-、DL-体のいずれも用いることができる。

生体内分解性ポリマーとしては、好ましくは、末端に遊離のカルボキシル基を有する生体内分解性ポリマー、例えば $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸類（例えば、グリコール酸、乳酸等）から合成された重合体（例えば、乳酸重合体、乳酸-グリコール酸共重合体等）、ポリ- $\alpha$ -シアノアクリル酸エステル等が、より好ましくは $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸類から合成された重合体等が、さらに好ましくは乳酸-グリコール酸重合体等が挙げられる。本明細書においては、ポリ乳酸、ポリグリコール酸等の単重合体のみならず乳酸-グリコール酸共重合体も含めて、単に乳酸-グリコール酸重合体と称することがある。

生体内分解性ポリマーとして乳酸-グリコール酸重合体（乳酸-グリコール酸共重合体又は単重合体）を用いる場合、その組成比（モル%）は約100/0ないし約40/60が好ましく、約85/15ないし約50/50が更に好ましい。

25 乳酸-グリコール酸重合体の重量平均分子量は、約3,000ないし約50,000が好ましく、約3,000ないし約25,000がより好ましく、約5,000から約20,000が更に好ましい。

乳酸-グリコール酸重合体の分散度（重量平均分子量/数平均分子量）は約1.2ないし約4.0が好ましく、約1.5ないし約3.5が更に好ましい。

本明細書での乳酸-グリコール酸重合体の重量平均分子量は、重量平均分子量が  
120,000、52,000、22,000、9,200、5,050、2,  
950、1,050、580、162の9種類のポリスチレンを基準物質として  
5 ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）で測定したポリスチレン換  
算の値を示す。また、乳酸-グリコール酸重合体の分散度は、前記乳酸-グリコー  
ル酸重合体の重量平均分子量の値から算出した値である。乳酸-グリコール酸重  
合体の重量平均分子量の測定は、GPCカラムKF804L x 2（昭和電工製）、  
RIモニター L-3300（日立製作所製）を使用し、移動相としてクロロホルム  
10 は、ポリスチレン換算重量平均分子量と示されることもある。

前記末端に遊離のカルボキシル基を有する生体内分解性ポリマーとは、末端基  
定量による数平均分子量と上記のGPC測定による数平均分子量がほぼ一致する  
ポリマーであり、末端基定量による数平均分子量は以下のようにして算出される。

約1gないし約3gの生体内分解性ポリマーをアセトン（25ml）とメタノール  
15 （5ml）との混合溶媒に溶解し、フェノールフタレインを指示薬としてこの溶液中  
のカルボキシル基を0.05Nアルコール性水酸化カリウム溶液で、室温（2  
0℃）で攪拌下、速やかに滴定して末端基定量による数平均分子量を次式で算出  
した。

末端基定量による数平均分子量 =  $20000 \times A / B$

20 A：生体内分解性ポリマーの質量（g）

B：滴定終点までに添加した0.05Nアルコール性水酸化カリウム溶液（ml）

末端基定量による数平均分子量が絶対値であるのに対して、GPC測定による  
数平均分子量は、各種分析・解析条件（例えば、移動相の種類、カラムの種類、  
基準物質、スライス幅の選択、ベースラインの選択等）によって変動する相対値  
25 であるため、一義的な数値化は困難であるが、両測定による数平均分子量がほぼ  
一致するとは、例えば、 $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸類から合成された重合体にお  
いて、末端基定量による数平均分子量がGPC測定による数平均分子量の約0.  
5倍から約2倍の範囲内であること、好ましくは約0.7倍から約1.5倍の範囲  
内であることをいう。

例えば、1種類以上の $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸類から無触媒脱水重縮合法で合成され、末端に遊離のカルボキシル基を有する重合体では、GPC測定による数平均分子量と末端基定量による数平均分子量とがほぼ一致する。これに対し、環状二量体から触媒を用いて開環重縮合法で合成され、末端に遊離のカルボキシル基を本質的には有しない重合体では、末端基定量による数平均分子量がGPC測定による数平均分子量の約2倍以上に大きく上回る。この相違によって末端に遊離のカルボキシル基を有する重合体は、末端に遊離のカルボキシル基を有しない重合体と明確に区別することができる。

10 末端に遊離のカルボキシル基を有する乳酸-グリコール酸重合体は、自体公知の製造法、例えば特開昭61-28521号公報に記載の方法（例えば無触媒下の脱水重縮合反応又は無機固体酸触媒下での脱水重縮合反応による製造方法等）に従って製造することができる。

15 乳酸-グリコール酸重合体の分解・消失速度は、組成比あるいは重量平均分子量によって大きく変化するが、一般的にはグリコール酸分率が低いほど分解・消失が遅いため、グリコール酸分率を低くするかあるいは分子量を大きくすることによって放出期間を長くすること（例えば、約6ヶ月）ができる。逆に、グリコール酸分率を高くするかあるいは分子量を小さくすることによって放出期間を短くすること（例えば、約1週間）もできる。例えば、1週間ないし2ヶ月型徐放性製剤とするには、前記組成比及び重量平均分子量の範囲の乳酸-グリコール酸重合体を用いるのが好ましい。

25 従って、本発明において用いる生体内分解性ポリマーの組成は、目的とする生理活性ポリペプチドの種類、所望の徐放期間等に応じて、適宜選択されることが好ましい。その具体例としては、例えば、タンパク質としてGHを用いる場合、乳酸-グリコール酸重合体を用いることが好ましく、該乳酸-グリコール酸重合体としては、その乳酸/グリコール酸組成比（モル%）が約85/15ないし約50/50の乳酸-グリコール酸共重合体が好ましく、更に好ましくは約75/25ないし約50/50の乳酸-グリコール酸共重合体である。またその重量平均分子量は約8,000ないし約20,000が好ましく、更に好ましくは約10,000ないし約20,000である。また、乳酸-グリコール酸重合体の分散度(重

量平均分子量／数平均分子量）は約 1.2 ないし約 4.0 が好ましく、更に好ましくは約 1.5 ないし約 3.5 である。

乳酸－グリコール酸重合体は、前記公報記載の方法等、公知の方法に従い製造できる。該重合体は無触媒脱水重縮合で製造されたものが好ましい。前記 G P C

- 5 測定法による数平均分子量と末端基定量法による数平均分子量とが、ほぼ一致する乳酸－グリコール酸重合体 (P L G A) を用いることが好ましい。

該重合体は組成比及び／または重量平均分子量の異なる 2 種の乳酸－グリコール酸重合体を任意の割合で混合して用いてもよい。このような例としては、組成比 (乳酸／グリコール酸) (モル%) が約 75 / 25 で重量平均分子量が約 10,

- 10 000 の乳酸－グリコール酸共重合体と、組成比 (乳酸／グリコール酸) (モル%) が約 50 / 50 で重量平均分子量が約 12,000 の乳酸－グリコール酸共重合体との混合物等が用いられる。混合する際の重量比は、好ましくは約 25 / 75 ないし約 75 / 25 である。

徐放性製剤の基剤として用いる生体内分解性ポリマーは、前記した生体内分解性ポリマーの金属塩であってもよく、例えば、WO 97 / 01331 号公報に記載の各種生体内分解性ポリマーの多価金属塩等が用いられる。好ましくは乳酸－グリコール酸重合体の多価金属塩 (さらに好ましくは亜鉛塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等、より好ましくは亜鉛塩等) 等が用いられる。該多価金属塩の金属種としては、生体に悪影響を及ぼさない化合物であれば特に限定されず、例えば 20 価 (例、鉄、亜鉛、銅、カルシウム、マグネシウム、アルミニウム、スズ、マンガン等)、3 価 (例、鉄、アルミニウム、マンガン等)、4 価 (例、スズ等) などの多価金属も用いることができる。

- 25 本明細書においては、生体内分解性ポリマーが金属塩の場合も含めて生体内分解性ポリマーと称することがあり、例えば乳酸－グリコール酸重合体が多価金属塩の場合も乳酸－グリコール酸重合体と称することがある。

これらの生体内分解性ポリマーの多価金属塩は WO 97 / 01331 号公報に記載の方法及びこれに準じる方法により製造することができる。

また、生体内分解性ポリマーの多価金属塩が亜鉛塩の場合には、生体内分解性ポリマーと酸化亜鉛とを有機溶媒中で反応させることによって製造することもで

きる。生体内分解性ポリマーの亜鉛塩は、例えば以下示す方法で製造することができる。

- まず生体内分解性ポリマーと酸化亜鉛とを有機溶媒中に共存させて、生体内分解性ポリマー・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を製造する。この際、生体内分解性ポリマーの溶液中濃度は分子量、有機溶媒等の種類によって異なるが、例えば約0.1ないし約80% (W/W)、好ましくは約1ないし約70% (W/W)、更に好ましくは約2ないし約60% (W/W) である。また、添加する酸化亜鉛量は、特開平10-231252号公報に記載されたように、有機溶媒の種類によって異なるが、例えば生体内分解性ポリマー量の約0.001ないし約2% (W/W)、好ましくは約0.01ないし約1.5% (W/W)、更に好ましくは約0.1ないし約1% (W/W) である。有機溶媒への生体内分解性ポリマー及び酸化亜鉛の添加順序は、生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液に酸化亜鉛を粉末状であるいは該有機溶媒に懸濁した状態で添加してもよく、逆に酸化亜鉛の有機溶媒懸濁液中に生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液を添加してもよい。また、両者を粉末状で混和後、有機溶媒を添加してもよい。

- 徐放性製剤の製造において生体内分解性ポリマーの溶解に用いる有機溶媒は、沸点120℃以下であることが好ましい。該有機溶媒としては、例えばハロゲン化炭化水素（例えば、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素等）、アルコール類（例えば、エタノール、メタノール、1,4-ブタンジオール、1,5-ペンタンジオール等）、酢酸エチル、アセトニトリル等が挙げられる。これらは適宜の割合で混合して用いてもよい。有機溶媒を単独で用いる場合、例えばジクロロメタン、アセトニトリル等が好ましい。有機溶媒を混合溶媒として用いる場合、例えばハロゲン化炭化水素（例えば、ジクロロメタン、クロロホルム等）と、アルコール類（例えば、エタノール、メタノール、1,4-ブタンジオール、1,5-ペンタンジオール等）あるいはアセトニトリルとの組み合わせが好ましい。特に、ジクロロメタンとアセトニトリルとの組み合わせが汎用される。ハロゲン化炭化水素と、アルコール類あるいはアセトニトリルとの混合比（体積比）は約40:1ないし約1:1であり、好ましくは約20:1ないし約1:1である。特に、ハロゲン化炭化水素（ジクロロメタン等）を単独、あるいはハロゲン化炭化

水素とアセトニトリルとの9 : 1ないし1 : 1の混合溶媒を用いることが望ましい。また、生体内分解性ポリマーの溶液中濃度は分子量、有機溶媒等の種類によって異なるが、例えば約0.01ないし約80% (W/W)、好ましくは約0.1ないし約70% (W/W)、更に好ましくは約1ないし約60% (W/W) である。

徐放性製剤は、水混和性の有機溶媒及び／又は揮発性塩類を添加したタンパク質含有溶液（例えば、生理活性ポリペプチド溶液）を凍結乾燥して得られる粉体（S）を、生体由来物質または合成ポリマー（例えば、生体内分解性ポリマー）を溶解した有機溶媒液（O）に分散させた、S/O型分散液から溶媒を除去することにより製造される。その製造法としては、例えば（a）水中乾燥法（S/O/W法）、（b）相分離法（コアセルベーション法）及び（c）噴霧乾燥法、あるいはこれらに準じた方法等が挙げられる。以下に徐放性製剤として、例えばマイクロカプセルを製造する場合の製造方法について記述する。

#### 15 (a) 水中乾燥法（S/O/W法）

本法によれば、まずタンパク質水溶液に水混和性の有機溶媒及び／又は揮発性塩類を添加した後、凍結乾燥によりタンパク質粉体（S）を作成する。次に生体内分解性ポリマーを有機溶媒に溶解し、この有機溶媒液中に上記のタンパク質微細粉体を添加し分散させる。この際、タンパク質と生体内分解性ポリマーとの比率（重量比）は、例えば約1 : 1000ないし約1 : 1、好ましくは約1 : 200ないし約1 : 5、更に好ましくは約1 : 100ないし約1 : 5である。

また、タンパク質粉体を有機溶媒液中に均一に分散および微粒化させるため、外部物理的エネルギーを加えることが好ましい。その方法としては例えば、超音波照射、タービン型攪拌器、ホモジナイザー等が用いられる。この時の有機溶媒液中でのタンパク質の平均粒子径としては約0.5 ~ 20  $\mu\text{m}$ 、さらに好ましくは約0.7 ~ 10  $\mu\text{m}$ 、より好ましくは約1 ~ 5  $\mu\text{m}$ であることが望ましく、本発明の製造法により得られたタンパク質粉体を用いることにより達成される。

次いでこのようにして調製された有機溶媒分散液（S/O型分散液）を、更に水性溶媒（W）中に添加して、上記と同様の外部物理的エネルギー、例えば超音

波照射、タービン型攪拌器、あるいはホモジナイザー等によりS/O/W型エマルジョンを形成させる。以後、油相溶媒を蒸発させマイクロカプセルを製造する。この際の水相体積は、一般的には油相体積の約1倍ないし約10,000倍から選ばれる。更に好ましくは約2倍ないし約5,000倍から選ばれる。特に好ましくは約5倍ないし約2,000倍から選ばれる。

- 上記外水相中には、乳化剤を加えてもよい。該乳化剤としては、一般的に安定なS/O/Wエマルジョンを形成できるものであれば何れでもよい。乳化剤としては、例えばアニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、レシチン、ゼラチン、ヒアルロン酸等が挙げられる。これらは適宜組み合わせて使用してもよい。外水相中の乳化剤の濃度は、好ましくは約0.001%ないし20% (w/w) である。更に好ましくは約0.01%ないし10% (w/w)、特に好ましくは約0.05%ないし5% (w/w) である。

- このようにして得られたマイクロカプセルは、遠心分離あるいは濾過操作により分取した後、マイクロカプセルの表面に付着している乳化剤等を蒸留水による洗浄で除去し、再び蒸留水等に分散して凍結乾燥する。その後必要であれば、加温してマイクロカプセル中の水分及び有機溶媒を更に除去する。減圧下に加温してもよい。加温条件としては、用いた生体内分解性ポリマーのガラス転移温度以上で、マイクロカプセルの各粒子が互いに付着しない程度の温度で加熱乾燥する。好ましくは、生体内分解性ポリマーのガラス転移温度より10℃低い温度からガラス転移温度より約20℃高い温度の範囲で加熱乾燥する。ここでガラス転移温度とは、示差走査熱量計を用い、加温速度毎分10ないし20℃で昇温した際に得られる中間点を云う。

## 25 (b) 相分離法 (コアセルベーション法)

本法においては、前記(a)のS/O型分散液にコアセルベーション剤を攪拌下徐々に加えマイクロカプセルを析出、固化させる。該コアセルベーション剤は、上記分散液の約0.01倍ないし約1,000倍の体積量を加えられる。更に好ましくは、約0.05倍ないし約500倍、特に好ましくは約0.1倍ないし約20



0 倍の体積量である。コアセルベーション剤としては、生体内分解性ポリマーを溶解する有機溶媒と混和する高分子系、鉱物油系又は植物油系の化合物で使  
5 用した生体内分解性ポリマーを溶解しないものであればよい。具体的には、例えばシリコン油、ゴマ油、大豆油、コーン油、綿実油、ココナッツ油、アマニ油、鉱物油、*n*-ヘキサン、*n*-ヘプタン等が用いられる。これらは2種以上混合して用いてもよい。このようにして得られたマイクロカプセルを濾過分取した後、ヘプタン等により繰り返し洗浄してコアセルベーション剤を除去する。更に、(a)と同様に洗浄し、次いで凍結乾燥する。

水中乾燥法及びコアセルベーション法でのマイクロカプセルの製造では、粒子  
10 同士の凝集を防ぐために凝集防止剤を加えてもよい。該凝集防止剤としては、例えばマンニトール、ラクトース、ブドウ糖、デンプン類（例えば、コーンスターチ等）、ヒアルロン酸あるいはこのアルカリ金属塩等の水溶性多糖、グリシン、フィブリン、コラーゲン等の蛋白質、塩化ナトリウム、リン酸水素ナトリウム等の無機塩類等が適宜用いられる。

#### (c) 噴霧乾燥法

本法においては、前記(a)のS/O型分散液を、ノズルを用いてスプレードライヤー（噴霧乾燥器）の乾燥室内へ噴霧し、極めて短時間に微粒化液滴内の有機溶媒を揮発させ、マイクロカプセルを製造する。該ノズルとしては、例えば二  
20 流体ノズル型、圧力ノズル型、回転ディスク型等がある。この際所望により、上記の分散液と同時に、マイクロカプセル粒子同志の凝集防止を目的として前記凝集防止剤の水溶液を別ノズルより噴霧することも有効である。このようにして得られたマイクロカプセルは、前記(a)と同様にして洗浄し、必要であれば加温（要すれば減圧下）により、水分及び有機溶媒を更に除去する。

徐放性製剤は微粒子状であることが好ましい。なぜならば、徐放性製剤は皮下あるいは筋肉内注射に通常使用される注射針を通して投与される方が、患者に対し過度の苦痛を与えることがないからである。該徐放性製剤の粒子径は、例えば平均粒子径として約0.1ないし300  $\mu\text{m}$ 、好ましくは約1ないし150  $\mu\text{m}$ 、特

に好ましくは約2ないし100 $\mu\text{m}$ である。

徐放性製剤に含まれるタンパク質の含量は、例えば約0.1ないし40% (W/W)、好ましくは約0.2ないし20% (W/W) である。該タンパク質の平均粒子径は好ましくは約0.5~20 $\mu\text{m}$ 以下、さらに好ましくは約0.7~10 $\mu\text{m}$ 、

5 より好ましくは約1~5 $\mu\text{m}$ である。

また、徐放性製剤に含まれる生体由来物質または合成ポリマー（好ましくは生体内分解性ポリマー）の含量は、例えば約30ないし99.9% (W/W)、好ましくは約60ないし97% (W/W)、さらに好ましくは約70ないし90% (W/W) である。

10 徐放性製剤のタンパク質の初期放出率〔投与後1日（24時間）までの放出率〕は、好ましくは約50%以下、さらに好ましくは約1ないし40%、より好ましくは約3ないし35%である。なお、該初期放出率は本発明の徐放性製剤皮下投与後24時間までの血中濃度のAUC (Area Under the Concentration) を、タンパク質溶液皮下投与後24時間までのAUCから得られる投与量-AUC直線  
15 に適用させることにより初期放出量が得られ、さらに初期放出率が算出される。

徐放性製剤は、例えばマイクロカプセルとして、あるいはマイクロカプセルを原料物質として種々の剤形に製剤化し、非経口剤（例えば、筋肉内、皮下、臓器等への注射剤又は埋め込み剤、鼻腔、直腸、子宮等への経粘膜剤等）、経口剤（例えば、カプセル剤（例えば、硬カプセル剤、軟カプセル剤等）、顆粒剤、散剤等  
20 の固形製剤、懸濁剤等の液剤等）等として投与することができる。

徐放性製剤は特に注射用であることが好ましい。例えば、徐放性製剤がマイクロカプセルである場合、マイクロカプセルを分散剤（例えば、Tween 80、HCO-60等の界面活性剤、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ヒアルロン酸等の多糖類等）、保存剤（例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン等）、  
25 等張化剤（例えば、塩化ナトリウム、マンニトール、ソルビトール、ブドウ糖等）等と共に水性懸濁剤とすることにより実用的な注射用徐放性製剤が得られる。また、ゴマ油、コーン油等の植物油あるいはこれにレシチン等のりん脂質を混合したもの、あるいは中鎖脂肪酸トリグリセリド（例えば、ミグリオール812）と共に分散して油性懸濁剤として実際に使用できる徐放性注射剤とする。

徐放性製剤が例えばマイクロカプセルである場合、マイクロカプセルの平均粒子径は、懸濁注射剤として使用する場合には、その分散度、通針性を満足する範囲であればよく、例えば平均粒子径として約0.1ないし約300  $\mu\text{m}$ の範囲が挙げられる。平均粒子径は、好ましくは約1ないし約150  $\mu\text{m}$ 、特に好ましくは約2ないし約100  $\mu\text{m}$ の範囲である。

上記したマイクロカプセルを無菌製剤にするには、製造全工程を無菌にする方法、ガンマ線で滅菌する方法、防腐剤を添加する方法等が挙げられるが、特に限定されない。

該徐放性製剤は、低毒性で、哺乳動物（例えば、ヒト、牛、豚、犬、ネコ、マウス、ラット、ウサギ等）に対して安全に用いることができる。

徐放性製剤の適応は、使用するタンパク質により種々異なる。タンパク質が、例えばインスリンである場合には、糖尿病等、インターフェロン- $\alpha$ である場合には、ウイルス性肝炎（例えば、C型肝炎、HBe 抗原陽性活動性肝炎等）、癌（例えば、腎癌、多発性骨髄腫等）等、エリスロポエチンの場合には貧血（例えば、腎透析時貧血等）等、G-CSFの場合には好中球減少症（例えば、制ガン剤治療時）、感染症等、IL-2の場合には癌（例えば、血管内皮腫等）等、FGFの場合には骨折、創傷（床ずれ等）、歯周病、消化管潰瘍等、FGF-9の場合には血小板減少症等、NGFの場合には老人性痴呆、神経病（ニューロパシー）等、TPAの場合には血栓症等、腫瘍壊死因子の場合には癌等の治療又は予防に有効である。また、GH含有徐放性製剤では、GHの成長ホルモン作用に基づき、GH分泌不全性低身長症（下垂体性小人症）の他、ターナー症候群、慢性腎疾患、軟骨発育不全症（軟骨異栄養症）、更には成人成長ホルモン欠損症（成人GHD）、AIDS等の消耗性疾患の治療にも適応できる。また、GHはダウン症候群、シルバー症候群、骨形成不全症、あるいは若年性慢性関節症等の疾患にも適応され、有効な治療効果を得たとの報告もあり、GH含有徐放性製剤はこれらの疾患にも適応可能である。更にはうっ血性心不全症等の治療又は予防にも有効である。その他、GH含有徐放性製剤が適応できる対象としては、臓器移植時やAIDS患者の薬物治療時の造血、低栄養状態の改善、腎性貧血、狭心症、高脂血症、肥満、火傷・創傷・潰瘍の治療促進、外科侵襲（手術・外傷）／術後の早期回復、敗血症、骨

粗鬆症の骨折予防、骨粗鬆症による骨折患者の術後筋力早期回復、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、褥瘡等が挙げられる。また、虚弱老人の生活の質（QOL）の向上を目的とする抗老化薬として、あるいはhGHの神経保護作用により神経変性疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病、脳血管障害など）の進展抑制および改善にも

5 効果が期待できる。GHを徐放性製剤化することにより、GH連日皮下注射剤よりも、これらの適応症に対してすぐれた薬効が得られる。

徐放性製剤の投与量は、タンパク質の種類と含量、放出の持続時間、対象疾病、対象動物等によって種々異なるが、該タンパク質の有効濃度が体内で保持される量であればよい。該タンパク質の投与量としては、例えば徐放性製剤が2週間型

10 製剤である場合、好ましくは成人1人当たり約0.0001ないし約10mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。更に好ましくは約0.05ないし約1mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。タンパク質の投与量としては、例えば徐放性製剤が1ヶ月型製剤である場合、好ましくは成人1人当たり約0.0002ないし約20mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。更に好ましくは約

15 0.1ないし約2mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。

投与回数は、1週間に1回、2週間に1回、1ヶ月に1回、2ヶ月に1回等、該タンパク質の種類と含量、剤型、放出の持続時間、対象疾病、対象動物等によって適宜選ぶことができる。好ましくは1週間ないし2ヶ月型徐放性製剤、さらに好ましくは1週間ないし1ヶ月型徐放性製剤が挙げられる。

20 例えば、約2週間の徐放期間を有する徐放性製剤とする場合には、徐放性製剤の基材として、乳酸とグリコール酸のモル比が約55：45～45：55（例えば、約50：50）である乳酸－グリコール酸共重合体を用いることが好ましい。また、該乳酸－グリコール酸共重合体の重量平均分子量は約10000～15000（例えば13000）であることが好ましい。

25 徐放性製剤の有効成分であるタンパク質が、例えばインスリンである場合には、糖尿病の成人に対する投与量は、有効成分として通常、約0.001ないし約1mg/kg体重、好ましくは約0.01ないし約0.2mg/kg体重の範囲から適宜選び、1週間に1回投与するのがよい。

徐放性製剤の有効成分であるタンパク質が、GHの場合には、投与量は、GH

の種類と含量、放出の持続時間、対象疾病、対象動物等によって種々異なるが、該GHの有効濃度が体内で保持される量であればよい。前記疾患の治療において、例えば徐放性製剤が2週間型製剤である場合、GHの投与量は有効成分として、好ましくは、小児あるいは成人1人当たり約0.01ないし約5mg/kg体重（約0.03ないし約15 IU/kg体重）の範囲から適宜選択して安全に投与することができる。更に好ましくは約0.05ないし約1mg/kg体重（約0.15ないし約3 IU/kg体重）の範囲から適宜選ぶことができる。投与回数は、1週間に1回、2週間に1回あるいは1ヶ月に1回等、GH含量、剤型、放出の持続時間、対象疾病、対象動物等によって適宜選ぶことができる。

- 10 該徐放性製剤は、常温あるいは冷所に保存することが好ましい。徐放性製剤は、冷所に保存することが更に好ましい。ここでいう常温あるいは冷所とは、日本薬局方において定義されるものである。すなわち、常温とは15ないし25℃を、冷所とは15℃以下を意味する。冷所のうち、とりわけ2ないし8℃が好ましい。

- 一方で、約3～5週間の徐放期間を有するGH含有徐放性製剤を提供することが求められているが、本発明者らは本発明を完成させる過程で、約3～5週間の徐放期間を有するGH含有徐放性製剤が、特定の徐放性製剤の基剤を用いることにより得られることを見出した。

- 約3～5週間の徐放期間を有するGH含有徐放性製剤は、例えば前記したマイクロカプセルを製造する場合の製造法に従って得ることができる。マイクロカプセルの製造に用いるGH粉体は、本発明の製造法はもちろんのこと、いかなる方法で得られたものであってもよい。GH粉体の平均平均粒子径は、好ましくは約0.5～20 $\mu$ m、さらに好ましくは0.7～10 $\mu$ m、より好ましくは約1～5 $\mu$ mである。また、GHの変性度を定義した時、GH粉体は $\alpha$ -ヘリックスを約45%以上保持していることが好ましく、約50%以上保持していることがさらに好ましい。

- 25 徐放性製剤の基剤としては、乳酸とグリコール酸のモル比が約60：40～70：30（例えば約65：35）である乳酸-グリコール酸共重合体を用いることが好ましい。また、該乳酸グリコール酸共重合体の重量平均分子量は約10000～18000（例えば14500）であることが好ましい。

得られた約3～5週間の徐放期間を有するGH含有徐放性マイクロカプセルを

- 注射用として前記疾患の治療に用いる場合、GHの投与量は有効成分として、好ましくは、小児あるいは成人1人当たり約0.02ないし約10mg/kg体重(約0.06ないし約30IU/kg体重)の範囲から適宜選択して安全に投与することができる。更に好ましくは約0.1ないし約2mg/kg体重(約0.3ないし約6IU/kg体重)の範囲から適宜選ぶことができる。

### 実施例

以下に実施例、比較例、参考例及び試験例を挙げて、更に具体的に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

- 10     なお、冷却速度の算出において、凍結の確認が困難である場合には任意の単位時間(10秒以上)での降下温度を求め、算出された最大値を各実施例の冷却速度とした。

### 実施例1

- 15     ウシ血清アルブミン(BSA)水溶液の凍結およびそれに引き続く真空乾燥

BSA水溶液(最終BSA濃度=2mg/mL)に酢酸アンモニウムを20倍モル等量添加し、0.22 $\mu$ mのろ過を行い凍結乾燥液処方(処方1)を調製した。この液を10℃以下に冷却した後、一定量を5分ごとに、凍結乾燥棚上の-45~-40℃に冷却したトレー(面積約1300cm<sup>2</sup>)に、流体の直径約0.3~0.5mmで塗布し、凍結乾燥(トリ

- 20     マスタ-A04:共和真空(凝結量10kgタイプ))することにより、BSA粉体を製造した。塗布中のトレー温度は-40~-30℃であった。このBSA粉体(S)140mgを乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)(乳酸/グリコール酸(モル比)=約50/50、ポリスチレン換算重量平均分子量=約13000)1.85gおよび酸化亜鉛10mgをジクロロメタン2.7mLに溶解して得た液(O)中で、ポリトロン(キネマチカ社)処理にて分散および微粒化させた。このS/O分散液100 $\mu$ Lにジクロロメタン2.5mLを添加した後、BSA微細粉体の平均粒子径をレーザー回折式粒度分布測定装置(SALD2000A:島津)を用いて測定した。

処方1を上記方法により凍結した場合のBSA微細粉体の平均粒子径を〔表1〕に示す。トレーへの塗布量を10mL/5分~80mL/5分と制御することにより、処

方1の冷却速度の平均値が $-108.7^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最大 $-156^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ) $\sim -35.1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最小 $-32.4^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )となり、BSA微細粉体の平均粒子径は $1.2\mu\text{m}\sim 6.1\mu\text{m}$ まで制御することが可能であった。

〔表1〕

	塗布量(5分当たり塗布量(mL)/トレ-)						
	10	25	40	50	60	70	80
平均粒子径( $\mu\text{m}$ )	1.2	2.8	3.1	2.5	3.5	4.2	6.1
冷却速度の平均値( $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )	-108.7	-92.1	-66.0	-68.8	-58.3	-49.4	-35.1

5

## 実施例2

BSA水溶液の凍結およびそれに引き続く真空乾燥

実施例1と同様に処方1のBSA水溶液を調製し、この液を室温とし、一定量を5分ごとに、凍結乾燥棚上の $-45\sim -40^{\circ}\text{C}$ に冷却したトレ- (面積約 $1300\text{cm}^2$ )に、  
 10 流体の直径約 $0.3\sim 0.5\text{mm}$ で塗布し、凍結乾燥(RL-603BS:共和真空(凝結量 $60\text{kg}$ タイプ))することにより、BSA粉体を無菌的に製造した。塗布中のトレ-温度は $-40\sim -30^{\circ}\text{C}$ であった。このBSA粉体を用いて、実施例1記載の方法で、BSA微細粉体の平均粒子径を測定した。

処方1を上記方法により凍結した場合のBSA微細粉体の平均粒子径を〔表  
 15 2〕に示す。トレ-への塗布量を $30\text{mL}/5\text{分}\sim 60\text{mL}/5\text{分}$ と制御することにより、処方1の冷却速度の平均値が $-98.9^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最大 $-101.1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ) $\sim -80.6^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最小 $-70.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )となり、BSA微細粉体の平均粒子径は $1.2\mu\text{m}\sim 5.0\mu\text{m}$ まで制御することが可能であった。

〔表2〕

	塗布量(5分当たり塗布量(mL)/トレ-)			
	30	40	50	60
平均粒子径( $\mu\text{m}$ )	1.2	1.9	2.4	5.0
冷却速度の平均値( $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )	-98.9	-97.7	-95.4	-80.6

20

## 実施例 3

hGH水溶液の凍結およびそれに引き続く真空乾燥

遺伝子組み換え型hGH水溶液(最終hGH濃度=2mg/mL)に酢酸アンモニウムを2.0倍モル等量添加し、0.22 $\mu$ mのろ過を行い凍結乾燥液処方(処方2)を調製し

- 5 た。この液を10℃以下に冷却し、その一定量を5分ごとに、凍結乾燥棚上の-45~-40℃に冷却したトレイ(面積1300cm<sup>2</sup>)に、流体の直径約0.3~0.5mmで塗布し、凍結乾燥(トリマスタ-A04:共和真空(凝結量10kgタイプ))することにより凍結乾燥粉末(以下、hGH粉体と略記する)を製造した。塗布中のトレイ温度は-40~-30℃であった。このhGH粉体を用いて、実施例1記載の方法で、hGH微細粉体の平均粒子径を測定した。

処方2を上記方法により凍結した場合のhGH微細粉体の平均粒子径を〔表3〕に示す。トレイへの塗布量を10mL/5分~86mL/5分と制御することにより、処方2の冷却速度の平均値が-201.0℃/分(最大-203.7℃/分)~-72.5℃/分(最小-54.6℃/分)となり、hGH微細粉体の平均粒子径は1.4 $\mu$ m~4.7 $\mu$ mまで制御する

15 ことが可能であった。

〔表3〕

	塗布量(5分当たり塗布量(mL)/トレイ)			
	10	60	70	86
平均粒子径( $\mu$ m)	1.4	2.3	3	4.7
冷却速度の平均値(℃/分)	-201.0	-88.7	-84.1	-72.5

## 実施例 4

hGH水溶液の凍結およびそれに引き続く真空乾燥

- 20 処方2のhGH水溶液を調製し、この液を室温とし、一定量を5分ごとに、凍結乾燥棚上の-45~-40℃に冷却したトレイ(面積約1300cm<sup>2</sup>)に、流体の直径約0.3~0.5mmで塗布し、凍結乾燥(RL-603BS:共和真空(凝結量60kgタイプ))することによりhGH粉体を無菌的に製造した。塗布中のトレイ温度は-40~-30℃であった。このhGH粉体を用いて、実施例1記載の方法で、hGH微細粉体の平均粒子径
- 25 を測定した。



処方2を上記方法により凍結した場合のhGH微細粉体の平均粒子径を〔表4〕に示す。トレーへの塗布量を50mL/5分～80mL/5分と制御することにより、処方1の冷却速度の平均値が-84.6℃/分(最大-87.4℃/分)～-67.3℃/分(最小-54.9℃/分)となり、hGH微細粉体の平均粒子径は2.7 $\mu$ m～5.5 $\mu$ mまで制御することが可能であった。

〔表4〕

	塗布量(5分当たり塗布量(mL)/トレー)			
	50	60	70	80
平均粒子径( $\mu$ m)	2.7	2.7	3.2	5.5
冷却速度の平均値(℃/分)	-84.6	-80.6	-76.6	-67.3

#### 実施例5A

##### B S A水溶液の凍結およびそれに引き続く真空乾燥

- 10 処方1のB S A水溶液を調製し、この液を室温とし、連続的に一定量を小滴ずつ、凍結乾燥棚上の-45～-40℃に冷却したトレー(面積約1300cm<sup>2</sup>)に、滴下流体の直径約2～3mmで滴下し、凍結乾燥(トリワタ-A04:共和真空(凝結量10kgタイプ))することによりB S A粉体を製造した。滴下中のトレー温度は、トレー当たりの滴下量が、60mL/5分の時は-40～-32℃、80mL/5分の時は-32～-22℃、140mL/5分の時は-34～-9℃、160mL/5分の時は-26～-8℃、150mL/5分の時は-22～-4℃であった。
- 15 このB S A粉体を用いて、実施例1記載の方法で、B S A微細粉体の粒子径を測定した。なお、トレー当たりの滴下量が、150mL/5分の時には、充填ノズルのシリコンチューブ径を2mmから4mmに変更した。

- 20 処方1を上記方法により凍結した場合のB S A微細粉体の平均粒子径を〔表5〕に示す。トレーへの滴下量を60mL/5分～160mL/5分と制御することにより、処方1の冷却速度の平均値が-92.6℃/分(最大-101.1℃/分)～-33.4℃/分(最小-32.6℃/分)となり、B S A微細粉体の平均粒子径は1.3 $\mu$ m～20.0 $\mu$ mまで制御することが可能であった。

〔表 5〕

	滴下量(5分当たり塗布量(mL)/トレ-)				
	60	80	140	160	150 チューブ径変更
平均粒子径( $\mu\text{m}$ )	1.3	1.4	2.4	3.8	20.0
冷却速度の平均値( $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )	-92.6	-85.3	-71.7	-49.7	-33.4

## 実施例 5 B

B S A 水溶液の凍結およびそれに引き続く真空乾燥

- 5 処方 1 の B S A 水溶液を調製し、この液を室温とし、連続的に一定量を小滴ずつ、凍結乾燥棚上の  $-50 \sim -40^{\circ}\text{C}$  に冷却したトレ- (面積約  $1300\text{cm}^2$ ) に、滴下流体の直径約  $2 \sim 3\text{mm}$  で滴下し、凍結乾燥 (RL-402BS : 共和真空 (凝結量  $40\text{kgタイプ}$ )) することにより B S A 粉体を無菌的に製造した。滴下中のトレ-温度は、500 mL の処方 1 の B S A 水溶液を充填する際のトレ-当たりの滴下量が、60 mL / 5 分の時は  $-40 \sim -31^{\circ}\text{C}$ 、80 mL / 5 分の時は  $-38 \sim -30^{\circ}\text{C}$ 、120 mL / 5 分の時は  $-28^{\circ}\text{C} \sim -12^{\circ}\text{C}$  であった。この B S A 粉体 (S) 300 mg を乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) (乳酸 / グリコール酸 (モル比) = 約 65 / 35、ポリスチレン換算重量平均分子量 = 約 14500) 1.69g および酸化亜鉛 10mg をジクロロメタン 2.7 mL に溶解して得た液 (O) 中で、ポリトロン (キネマチカ社) 処理にて分散および微粒化させた。
- 15 この S / O 分散液 100  $\mu\text{L}$  にジクロロメタン 2.5 mL を添加した後、B S A 微細粉体の平均粒子径をレーザー回折式粒度分布測定装置 (SALD2000A : 島津) を用いて測定した。

- 処方 1 を上記方法により凍結した場合の B S A 微細粉体の平均粒子径を〔表 6〕に示す。トレ-への滴下量を 60 mL / 5 分  $\sim$  120 mL / 5 分と制御することにより、処方 1 の冷却速度の平均値が  $-93.7^{\circ}\text{C}/\text{分}$  (最大  $-104.2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )  $\sim$   $-59.8^{\circ}\text{C}/\text{分}$  (最小  $-57.4^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ) となり、B S A 微細粉体の平均粒子径は  $1.2 \mu\text{m} \sim 2.4 \mu\text{m}$  まで制御することが可能であった。
- 20

〔表 6〕

	滴下量(5分当たり塗布量(mL)/トレ-)		
	60	80	120
平均粒子径( $\mu\text{m}$ )	1.2	1.4	2.4
冷却速度の平均値( $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )	-93.7	-88.5	-59.8

## 実施例 6 A

h G H 水溶液の凍結およびそれに引き続く真空乾燥

- 5 処方 2 の h G H 水溶液を調製し、この液を室温とし、連続的に一定量を小滴ずつ、凍結乾燥棚上の  $-45 \sim -40^{\circ}\text{C}$  に冷却したトレ- (面積約  $1300\text{cm}^2$ ) に、滴下流体の直径約  $2 \sim 3\text{mm}$  で滴下し、凍結乾燥 (トリマスタ-A04: 共和真空 (凝結量  $10\text{kg/day}$ )) することにより h G H 粉体を製造した。滴下中のトレ-温度は、トレ-当たりの滴下量が、 $140\text{mL}/5\text{分}$  の時は  $-38 \sim -18^{\circ}\text{C}$ 、 $160\text{mL}/5\text{分}$  の時は  $-28 \sim -2^{\circ}\text{C}$  であった。この h
- 10 G H 粉体を用いて、実施例 1 記載の方法で、h G H 微細粉体の平均粒子径を測定した。

- 処方 2 を上記方法により凍結した場合の h G H 微細粉体の平均粒子径を〔表 7〕に示す。トレ-への滴下量を  $140\text{mL}/5\text{分} \sim 160\text{mL}/5\text{分}$  と制御することにより、処方 2 の冷却速度の平均値が  $-74.1^{\circ}\text{C}/\text{分}$  (最大  $-79.2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )  $\sim -42.6^{\circ}\text{C}/\text{分}$  (最小-
- 15  $39.8^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ) となり、h G H 微細粉体の平均粒子径は  $1.9\mu\text{m} \sim 5.9\mu\text{m}$  まで制御することが可能であった。

〔表 7〕

	滴下量(5分当たり塗布量(mL)/トレ-)	
	140	160
平均粒子径( $\mu\text{m}$ )	1.9	5.9
冷却速度の平均値( $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )	-74.1	-42.6

## 実施例 6 B

- 20 h G H 水溶液の凍結およびそれに引き続く真空乾燥

hGH水溶液(最終hGH濃度=5mg/mL)に酢酸アンモニウムを20倍モル等量添加し、 $0.22\mu\text{m}$ のろ過を行った凍結乾燥液処方(処方3)および処方2のhGH水溶液を調製し、この液を室温とし、連続的に一定量を小滴ずつ、凍結乾燥棚上の $-50\sim-40^{\circ}\text{C}$ に冷却したトレー(面積約 $1300\text{cm}^2$ )に、滴下流体の直径約2  
5  
~3mmで滴下し、凍結乾燥(RL-402BS:共和真空(凝結量40kgタイプ))することによりhGH粉体を無菌的に製造した。滴下中のトレー温度は、トレー当たりの滴下量が、60mL/5分の時(充填液量1L)は $-35\sim-25^{\circ}\text{C}$ 、80mL/5分の時(充填液量500mL)は $-31\sim-24^{\circ}\text{C}$ 、94mL/5分の時(充填液量250mL)は約 $-30^{\circ}\text{C}$ であった。このhGH粉体を用いて、実施例5B記載の方法で、hGH微細粉体の粒子径を測定した。

- 10 処方2および3を上記方法により凍結した場合のhGH微細粉体の平均粒子径を〔表8〕に示す。処方2の冷却速度の平均値が $-87.4^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最大 $-95.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )~ $-83.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最小 $-76.6^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )の場合に、hGH微細粉体の平均粒子径は $1.3\mu\text{m}$ ~ $1.8\mu\text{m}$ まで制御することが可能であった。処方3のhGH水溶液では、冷却速度の平均値が $-93.4^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の場合に、hGH微細粉体の平均粒子径は $1.8\mu\text{m}$ に制御す  
15 ることが可能であった。

〔表8〕

	滴下量(5分当たり塗布量(mL)/トレ-)			
	94 (充填量250mL) 処方2	60 (充填量1L) 処方2	80 (充填量500mL) 処方2	80 (充填量100mL) 処方3
平均粒子径( $\mu\text{m}$ )	1.3	1.6	1.8	1.8
冷却速度の 平均値( $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )	-87.4	-86.4	-83.5	-93.4

### 実施例6C

hGH水溶液の凍結およびそれに引き続く真空乾燥

- 20 処方2のhGH水溶液を調製し、この液を室温とし、連続的に一定量を小滴ずつ、凍結乾燥棚上の $-50\sim-40^{\circ}\text{C}$ に冷却したトレー(面積約 $1300\text{cm}^2$ )に、滴下流体の直径約2~3mmで滴下し、1Lを充填し、凍結乾燥(RL-402BS:共和真空(凝

結量40kgタイプ))することによりhGH粉体を無菌的に製造した。

トレー当たりの滴下量60mL/5分および80mL/5分で得られたhGH粉体を用いて、実施例5B記載の方法でhGH微細粉体を調整して平均粒子径を測定した。トレー

一当たりの滴下量120mL/5分および140mL/5分で得られたhGH粉体を用いて、実

- 5 施例1記載の方法でhGH微細粉体を調整して平均粒子径を測定した。

処方2を上記方法により凍結した場合のhGH微細粉体の平均粒子径を〔表9〕に示す。hGH水溶液の1Lを充填した場合、滴下量を60mL/5分～140mL/5分と制御することにより、hGH微細粉体の平均粒子径は1.6 $\mu$ m～4.0 $\mu$ mまで制御することが可能であった。

- 10 〔表9〕

	滴下量(5分当たり塗布量(mL)/トレー)			
	60 (充填量1L)	80 (充填量1L)	120 (充填量1L)	140 (充填量1L)
平均粒子径( $\mu$ m)	1.6	2.5	3.1	4.0

#### 参考例1

##### B S A水溶液の凍結真空乾燥

処方1のB S A水溶液を調製し、この液を層厚が1mm、2mm、5mmとなるようにト  
15 レーに加え、約-5～0℃に冷却した。冷却したB S A水溶液を凍結乾燥機(トリ  
マタ-A04:共和真空(凝結量10kgタイプ))で-50～-40℃まで凍結し、凍結乾燥す  
ることにより凍結乾燥粉末(以下、B S A粉体と略記する)を製造した。得られた  
B S A粉体を用いて、実施例1記載の方法で、B S A微細粉体の平均粒子径を測  
定した。

- 20 処方1のB S A水溶液を上記方法により凍結した場合のB S A微細粉体の平均  
粒子径を〔表10〕に示す。該凍結乾燥法での冷却速度の平均値は約-2.1～  
-1.6℃/分となり、得られたB S A微細粉体の平均粒子径は28.9～35.  
0 $\mu$ mとなった。

〔表 1 0〕

	層 厚		
	1mm	2mm	5mm
平均粒子径 ( $\mu\text{m}$ )	35. 0	38. 9	28. 9
冷却速度の平均値 ( $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )	-2. 1	-1. 6	-2. 1

## 参考例 2

## B S A 水溶液の凍結真空乾燥

- 5 処方 1 の B S A 水溶液を調製し、この液を層厚が 1mm となるようにトレーに加え、凍結乾燥機 (トリワスタ-A04: 共和真空 (凝結量 10kg タイプ)) に仕込み、B S A 水溶液の温度を  $0^{\circ}\text{C}$  に制御した。次に凍結乾燥棚の温度を  $-4^{\circ}\text{C}/\text{h}$  の冷却速度で冷却し、B S A 水溶液を凍結させ、凍結乾燥し B S A 粉体を製造した。この B S A 粉体を用いて、実施例 1 記載の方法で、B S A 微細粉体の平均粒子径を測定した。
- 10 処方 1 の B S A 水溶液を上記方法により凍結した場合の B S A 微細粉体の平均粒子径を〔表 1 1〕に示す。上記方法における B S A 水溶液の冷却速度は、凍結乾燥棚の冷却速度と同一の約  $-4^{\circ}\text{C}/\text{h}$  である。この時の B S A 微細粉体の平均粒子径は  $32.5\mu\text{m}$  となった。

〔表 1 1〕

	層 厚
	1mm
平均粒子径 ( $\mu\text{m}$ )	32. 5
冷却速度 ( $^{\circ}\text{C}/\text{h}$ )	-4

15

実施例 1 ～ 6 C および参考例 1, 2 を比べた結果、冷却速度が遅いと、タンパク質微細粉体の平均粒子径が大きくなることが確認された。

## 実施例 7

- 20 h G H 水溶液の凍結およびそれに引き続く真空乾燥

処方2のhGH水溶液を調製し、この液を室温とし、断続的に一定量を、凍結乾燥棚上の $-25^{\circ}\text{C}$ 以下に冷却したトレー(面積約 $1300\text{cm}^2$ )に噴霧し、凍結乾燥(トリマスタ-A04:共和真空(凝結量 $10\text{kgタイプ}$ ))することによりhGH粉体を製造した。このhGH粉体を用いて実施例1記載の方法で、hGH微細粉体の平均粒子径を測定した。

処方2を上記方法により凍結した場合のhGH微細粉体の平均粒子径を〔表12〕に示す。トレーへの処方2の噴霧量を $50\text{mL}/5\text{分}$ ～ $100\text{mL}/5\text{分}$ と制御することにより、処方2の冷却速度の平均値が $-65.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最大 $-73.9^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )～ $-37.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最小 $-34.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )となり、hGH微細粉体の平均粒子径は $1.5\mu\text{m}$ ～ $9.5\mu\text{m}$ まで制御することが可能であった。

〔表12〕

	噴霧量(5分当たり塗布量(mL)/トレ-)		
	50	80	100
平均粒子径( $\mu\text{m}$ )	1.5	2.9	9.5
冷却速度の平均値( $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )	-65.3	-43.3	-37.3

### 実施例8

#### hGH含有マイクロカプセルの製造

- 15 乳酸-グリコール酸共重合体(乳酸/グリコール酸=50/50、ポリスチレン換算平均分子量=13,000、粘度= $0.145\text{dl/g}$ )1.85gと酸化亜鉛10mgとをジクロロメタン2.7mlに溶解した。この有機溶媒液に、実施例3中、塗布量(5分当たり塗布量(mL)/トレー)が10および60において得られた、hGH粉体140mgを添加し、ポリトロン(キネマチカ社)を用いて微粒化した。このS/O分散液を0.1%ポリビニルアルコール水溶液800mlに添加し、ホモミキサーを用いて攪拌・乳化した。室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させた後、遠心分離(約1,800rpm)することによりマイクロカプセルを分取した。次いで分取したマイクロカプセルを蒸留水400mlを用いて2回洗浄後、D-マンニトール0.2gを添加し凍結乾燥した。更に残留溶媒除去のため、4
- 25  $6^{\circ}\text{C}$ で3日間真空乾燥して2種のhGH含有マイクロカプセルを得た。

## 実施例 9

## hGH含有マイクロカプセルの製造

- 実施例 8 と同様の操作により、実施例 7 における噴霧量 (5 分当たり塗布量  
5 (mL)/トレイ) が 50 および 80 において得られた hGH 粉体 2 種の hGH 含有マイクロカプセルを得た。

## 実施例 10

## hGH含有マイクロカプセルの製造

- 10 乳酸-グリコール酸共重合体 (乳酸/グリコール酸 (モル比) = 約 65/35、  
ポリスチレン換算重量平均分子量 = 約 14500) 1.69 g および酸化亜鉛 10 mg をジクロロメタン 2.7 ml に溶解した。この有機溶媒液に実施例 6 B 中の処方 2 を滴下量 94 ml/5 分 (充填量 250 ml) で凍結後乾燥して得られた hGH 粉体 300 mg を添加し、ポリトロン (キネマチカ社) を用いて微粒化  
15 した。この S/O 分散液を 0.1% ポリビニルアルコール水溶液 800 ml に添加し、ホモミキサーを用いて攪拌・乳化した。室温で 3 時間攪拌してジクロロメタンを揮散させた後、遠心分離 (約 1,800 rpm) することによりマイクロカプセルを分取した。次いで分取したマイクロカプセルを蒸留水 400 ml を用いて 2 回洗浄後、D-マンニトール 0.2 g を添加し凍結乾燥した。更に残留溶媒除去のため、46℃で 3 日間真空乾燥して hGH 含有マイクロカプセルを得た。  
20

## 実施例 11

## hGH含有マイクロカプセルの製造

- 25 乳酸-グリコール酸共重合体 (乳酸/グリコール酸 (モル比) = 約 65/35、  
ポリスチレン換算重量平均分子量 = 約 14500) 1.69 g および酸化亜鉛 10 mg をジクロロメタン 2.7 ml に溶解した。この有機溶媒液に実施例 6 B 中の処方 3 を滴下量 80 ml/5 分 (充填量 100 ml) で凍結後乾燥して得られた hGH 粉体 300 mg を添加し、ポリトロン (キネマチカ社) を用いて微粒化した。この S/O 分散液を 0.1% ポリビニルアルコール水溶液 800 ml に添加



し、ホモミキサーを用いて攪拌・乳化した。室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させた後、遠心分離（約1,800rpm）することによりマイクロカプセルを分取した。次いで分取したマイクロカプセルを蒸留水400mlを用いて2回洗浄後、D-マンニトール0.2gを添加し凍結乾燥した。更に残留溶媒除去のため、46℃で3日間真空乾燥してhGH含有マイクロカプセルを得た。

## 実施例12

### hGH含有マイクロカプセルの製造

乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸／グリコール酸（モル比）＝約65／35、ポリスチレン換算重量平均分子量＝約14500）1.69gおよび酸化亜鉛10mgをジクロロメタン2.565mlに溶解した。この有機溶媒液に実施例6B中の処方2を滴下量94ml／5分（充填量250ml）で凍結後乾燥して得られたhGH粉体300mgを加えた後、エタノール0.135mlを添加し、ポリトロン（キネマチカ社）を用いて微粒化した。このS／O分散液を0.1%ポリビニルアルコール水溶液800mlに添加し、ホモミキサーを用いて攪拌・乳化した。室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させた後、遠心分離（約1,800rpm）することによりマイクロカプセルを分取した。次いで分取したマイクロカプセルを蒸留水400mlを用いて2回洗浄後、D-マンニトール0.2gを添加し凍結乾燥した。更に残留溶媒除去のため、46℃で3日間真空乾燥してhGH含有マイクロカプセルを得た。

## 試験例1

### in vivo放出性

免疫抑制SDラット（雄性、6週齢）に実施例8および9で得たマイクロカプセルを皮下投与し（hGH量として6mg／ラット）、経時的に採血後、その血清中のhGH濃度をラジオイムノアッセイ（AbビーズHGH：栄研化学）により測定し、hGH徐放性を評価した。免疫抑制SDラットは、プログラフ（藤沢薬品）を、マイクロカプセル投与3日前に0.4mg／ラット、投与時、4日後、7日後、11日後及び14日後にそれぞれ0.2mg／ラットを皮下投与して作成した。結

果を〔図1〕に示す。

〔図1〕の結果から明らかなように、塗布して得られたhGH粉体を用いて作成したマイクロカプセル投与後の血中hGH濃度は、噴霧して得られた粉体を用いて作成したマイクロカプセル投与後のものに比べ、高かった。これらの結果は、

5 すなわち塗布して得られたhGH粉体を用いて作成したマイクロカプセル製剤のバイオアベイラビリティーが、より高いことを示している。

## 試験例2

### FT-IRによるタンパク質微細粉体の高次構造解析

- 10 実施例4中、塗布量(5分当たり塗布量(mL)/トレイ)が80において得られたhGH粉体および、実施例7中、噴霧量(5分当たり塗布量(mL)/トレイ)が80において得られたhGH粉体の2種の粉体に対し、FT-IRによる高次構造解析を行った
- (ジャーナル オブ ファーマシューティカル サイエンス (Journal of Pharmaceutical Science) 87巻 1412-1420頁 1998年参照)。その結果をn=3の
- 15 平均±SDとして、〔表13〕に示す。〔表13〕に示すように、塗布して得られた実施例4のhGH粉体の $\alpha$ -ヘリックス含量は、噴霧して得られた実施例7のhGH粉体の $\alpha$ -ヘリックス含量に比べて、より一層高かった。重水中におけるhGHの $\alpha$ -ヘリックス含量は59%であることから、噴霧して得られた実施例7のhGH粉体では、重水中に対し39%の $\alpha$ -ヘリックスを保持していた。ま
- 20 た、塗布して得られた実施例4のhGH粉体は、重水中に対し53%の $\alpha$ -ヘリックスを保持していた。

〔表 1 3〕

実施例 4 塗布量：5 分当たり塗布量 80mL/トレー		実施例 7 噴霧量：5 分当たり塗布量 80mL/トレー		
波数 (cm <sup>-1</sup> )	割合	波数 (cm <sup>-1</sup> )	割合	帰属
1694.3±0.3	3.5±1.3	1694.3±0.2	3.5±0.4	β-sheet
1682.9±0.6	18.9±0.4	1684.8±0.1	13.7±0.2	unordered
1667.3±1.8	22.3±0.9	1666.9±0.6	35.7±1.7	unordered
1654.7±0.6	31.2±2.0	1653.5±0.2	23.3±2.0	α-helix
1641.5±0.4	14.6±0.7	1641.8±0.3	13.8±0.7	unordered
1630.1±0.3	6.0±0.9	1630.7±0.4	6.5±0.7	β-sheet
1615.8±0.2	3.6±0.1	1615.8±0.1	3.5±0.1	unordered

## 産業上の利用可能性

本発明によれば、高次構造を高く保持した安定なタンパク質粉体を、液化ガス  
5 に接触させることなく、簡便に製造することができる。従って、液化ガス中に噴霧し凍結後に乾燥するタンパク質微細粉体の製造法に比べて、断熱、温度差による機器材質の膨張収縮、無菌保持への対応、液化ガスの排気のための大がかりで高価な設備を用いる必要がない。

さらに、本発明の方法で得られたタンパク質粉体は簡便な微粒化処理により微  
10 細粉体とすることができ、このタンパク質微細粉体を用いれば、長期間に亘り安定した高い血中濃度を示す徐放性製剤を提供することができる。

また、成長ホルモン含有製剤を製造する際に、乳酸とグリコール酸のモル比が  
約 60 : 40 ~ 70 : 30 の乳酸-グリコール酸共重合体を基剤として用いること  
により、約 1 ヶ月間に亘り成長ホルモンを放出する徐放性製剤を製造すること  
15 ができる。

## 請求の範囲

1. タンパク質含有溶液を冷媒に充填して約-300~-10℃/分の冷却速度で凍結後、乾燥することを特徴とするタンパク質粉体の製造法。
- 5 2. タンパク質含有溶液を冷媒に塗布または滴下することを特徴とする請求項1記載の製造法。
3. 塗布または滴下する際、滴下流体の直径が約0.1ないし40mmである請求項2記載の製造法。
4. タンパク質含有溶液を液体冷媒に直接接触させないで凍結することを特徴とする請求項1記載の製造法。
- 10 5. タンパク質含有溶液に、揮発性の塩類あるいは水混和性の有機溶媒を添加することを特徴とする請求項1記載の製造法。
6. 揮発性の塩類が酢酸アンモニウムである請求項5記載の製造法。
7. 請求項1記載の製造法で得られるタンパク質粉体。
- 15 8. タンパク質が、分子量 約5,000ないし1,000,000ダルトンである請求項7記載のタンパク質粉体。
9. タンパク質が、ホルモン、サイトカイン、造血因子、増殖因子または酵素である請求項7記載のタンパク質粉体。
- 10 10. タンパク質が成長ホルモンまたはインスリンである請求項7記載のタンパク質粉体。
11. タンパク質が、タンパク質含有溶液中の $\alpha$ -ヘリックス含量に対して約45%以上の $\alpha$ -ヘリックスを保持していることを特徴とする請求項7記載のタンパク質粉体。
12. 請求項7に記載のタンパク質粉体を微粒化処理することを特徴とするタンパク質微細粉体の製造法。
- 25 13. タンパク質微細粉体の平均粒子径が約0.5ないし20 $\mu$ mとなるように微粒化処理することを特徴とする請求項12記載の製造法。
14. 請求項12記載の製造法で得られたタンパク質微細粉体を含有する徐放性製剤。

15. 徐放性製剤の基剤が生体由来物質または合成ポリマーである請求項14記載の徐放性製剤。

16. 生体由来物質または合成ポリマーが、生体内分解性ポリマーである請求項15記載の徐放性製剤。

5 17. 乳酸とグリコール酸のモル比が約60:40~70:30の乳酸-グリコール酸共重合体および成長ホルモンを含有する徐放性製剤。

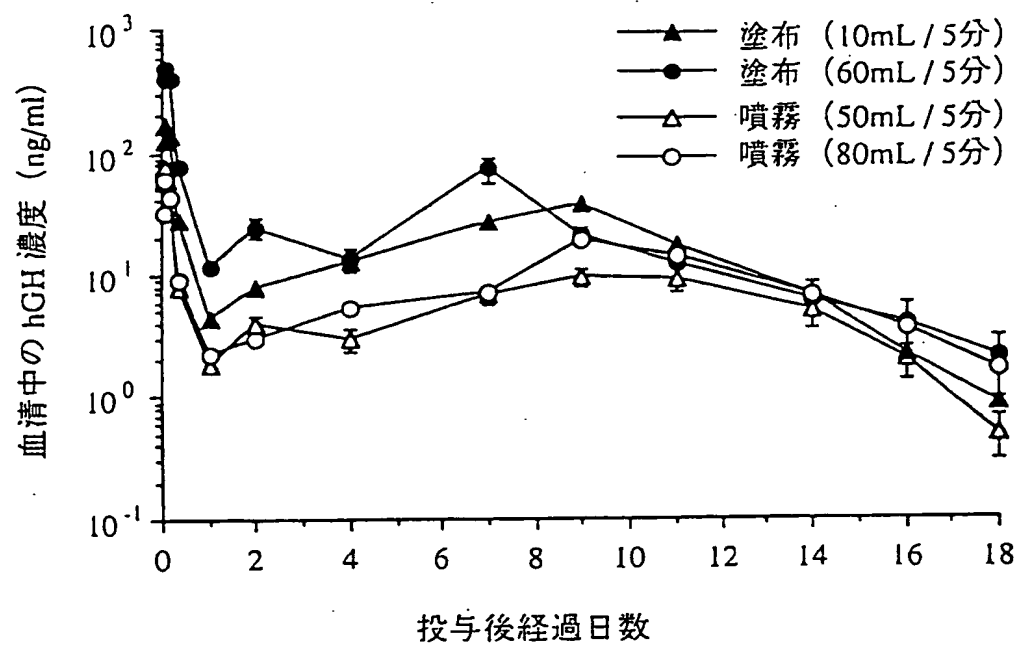
18. 請求項12記載の製造法で得られたタンパク質微細粉体を用いることを特徴とする徐放性製剤の製造法。

19. タンパク質含有徐放性製剤を製造するための請求項7記載のタンパク質粉  
10 体の使用。



1/1

[図 1]







## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06303

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/00, A61K9/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/00, A61K9/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US, 3607858, A (AMERICAN CYANAMID COMPANY), 21 September, 1971 (21.09.71) (Family: none)	1, 4-14, 18, 19 15-17
X Y	JP, 09-248177, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 22 September, 1997 (22.09.97) (Family: none)	1-14, 18, 19 15-17
X Y	JP, 09-095440, A (Roussel Morishita K.K.), 08 April, 1997 (08.04.97) (Family: none)	1-3, 5-14, 18, 19 15-17
X Y	JP, 05-194194, A (UNITIKA Ltd.), 03 August, 1993 (03.08.93) (Family: none)	1, 7-14, 18, 19 15-17
Y	US, 5534269, A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 09 July, 1996 (09.07.96) & JP, 08-003055, A & EP, 633020, A1 & NO, 9402515, A & FI, 9403205, A & CA, 2127317, A & CN, 1106653, A & AU, 9466145, A	15-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
12 December, 2000 (12.12.00)Date of mailing of the international search report  
26 December, 2000 (26.12.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K38/00, A61K9/14

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K38/00, A61K9/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	US, 3607858, A (AMERICAN CYANAMID COMPANY) 21. 9月. 1971 (21. 09. 71) (ファミリーなし)	1, 4-14, 18, 19 15-17
X Y	JP, 09-248177, A (雪印乳業株式会社) 22. 9月. 1997 (22. 09. 97) (ファミリーなし)	1-14, 18, 19 15-17
X Y	JP, 09-095440, A (ルセル森下株式会社) 8. 4月. 1997 (08. 04. 97) (ファミリーなし)	1-3, 5-14, 18, 19 15-17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 12. 00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎本 佳予子

印

4 P

9638

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP, 05-194194, A (ユニチカ株式会社) 3. 8月. 1993 (03. 08. 93) (ファミリーなし)	1, 7-14, 18, 19 15-17
Y	US, 5534269, A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 9. 7月. 1996 (09. 07. 96) &JP, 08-003055, A &EP, 633020, A1 &NO, 9402515, A &FI, 9403205, A &CA, 2127317, A &CN, 1106653, A &AU, 9466145, A	15-17